

## МОДЕЛЮВАННЯ ПРОЦЕСІВ ПРОМИСЛОВОГО ОБЛАДНАННЯ

УДК 665:664.3

Некрасов П.О.

### ДОСЛІДЖЕННЯ МЕХАНІЗМУ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГЛІЦЕРОЛІЗУ ЖИРІВ

На кафедрі технології жирів і бродильних виробництв в останні роки інтенсивно здійснюються роботи щодо створення технології жирів, збагачених діацилгліцеринами (ДАГ), які є основою для виробництва нового покоління олійно-жирових продуктів функціонального та лікувально-профілактичного призначення.

Перспективним способом отримання вказаних жирів є ферментативний гліцероліз жирової сировини.

**Мета роботи.** Було досліджено механізм та кінетику реакції, що є важним фактором при визначенні технологічних параметрів процесу ферментативного гліцеролізу в цілому.

Попередні дослідження показали, що максимальний вихід ДАГ спостерігається у випадку еквімолярного співвідношення триацилгліцеринів (ТАГ) до гліцерину. При такому співвідношенні реагентів у процесі гліцеролізу основні взаємодії будуть протікати між ТАГ і гліцерином, ДАГ і гліцерином, а також між ТАГ і моноацилгліцеринами (МАГ).

У якості модельних триацилгліцеринів (ТАГ) було обрано пальмову олію, яка у своєму складі містить найпоширеніші жирні кислоти, причому частки насичених і ненасичених ацилів практично однакові [1]. Це дозволяє переносити загальні закономірності, отримані для даної системи, на переважну більшість видів жирів, які використовуються у вітчизняній харчовій промисловості. Вміст ТАГ в олії, що застосовано, становив 97,5 %.

Спочатку для досліджень були приготовлені модельні суміші, що склалися із ТАГ, гліцерину та розчинника. У якості останнього була взята суміш н-гексана та трет-бутилового спирту в об'ємному співвідношенні 1:1. Нами було встановлено, що зазначена система розчинників забезпечує утворення гомогенної суміші субстратів. У всіх дослідженнях визначалася залежність початкової швидкості реакції від концентрації гліцерину, яка варіювалася від 0,001 моль/л до 0,1 моль/л, при різних, але усередині однієї серії експерименту постійних концентраціях ТАГ. Процес гліцеролізу виконувався при температурі 60 °C під дією ферментного препарату Novozym 435, кількість якого становила 10 % від маси субстратів.

Початкова швидкість реакції визначалася в такий спосіб. Протягом перших 15 хвилин процесу кожні 3 хвилини відбиралися проби, у яких методом високотемпературної газорідинної хроматографії визначався вміст ТАГ. Аналізи здійснювались у відповідності із AOCS Official Method Cd 11b-91 [2]. Використовувався хроматограф Clarus 500 Gas Chromatography (Perkin-Elmer), оснащений полум'яно-іонізаційним детектором (ПІД). Колонка Restek Rtx-65TG, капілярна; її геометричні параметри: довжина 30 м, 0,25 мм внутрішній діаметр, 0,2 мкм товщина нерухомої фази. Стаціонарна фаза Crossbond 35 % діметил – 65 % діфенілполісілоксан. Температурна програма 80 °C (0 хв.), 10 °C/хв. до 320 °C (0 хв.), 5 °C/хв. до 360 °C (15 хв.) Температура інжектора – 320 °C, температура детектора – 370 °C. Газ-носіє – гелій. Швидкість газу-носія 3 см<sup>3</sup>/хв. Спліт 1 : 50. Витрата повітря для ПІД – 450 см<sup>3</sup>/хв., витрата водню для ПІД – 45 см<sup>3</sup>/хв. Обсяг проби, що вводився, – 0,5 мкл.

Потім будувалися залежності концентрації ТАГ від часу реакції. Усі вони мали вигляд спадаючої експоненти та описувались виразом (1):

$$C(\tau) = C_0 \cdot e^{-k \cdot \tau}, \quad (1)$$

де  $C(\tau)$  – концентрація ТАГ в реакційній суміші через визначений час  $\tau$ , моль/л;  $C_0$  – початкова концентрація ТАГ, моль/л;  $k$  – константа швидкості,  $\text{хв}^{-1}$ ;  $\tau$  – час реакції, хв. Визначення констант швидкості здійснювалось методом нелінійної регресії. Початкова швидкість реакцій визначалась шляхом диференціювання рівняння (1) за часом та знаходження швидкості в нульовий момент перебігу реакцій.

Отримані результати досліджень, що виконано у 2 паралелях, в графічному вигляді представлено на рис. 1.

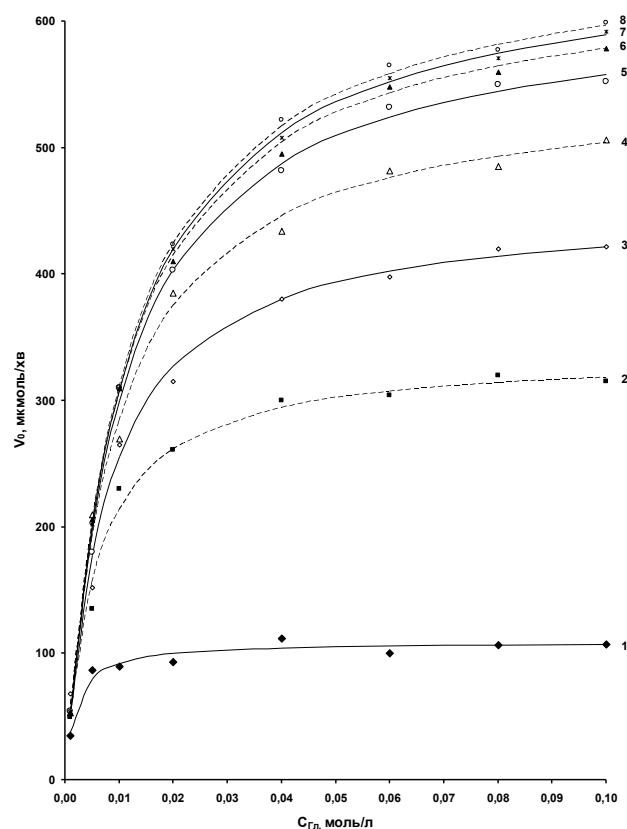


Рисунок 1 – Залежність початкової швидкості реакцій від концентрації гліцерину при фіксованих концентраціях ТАГ в межах кожної серії експериментів  
 1 –  $C_{\text{ТАГ}} = 0,001$  моль/л; 2 –  $C_{\text{ТАГ}} = 0,005$  моль/л; 3 –  $C_{\text{ТАГ}} = 0,01$  моль/л;  
 4 –  $C_{\text{ТАГ}} = 0,02$  моль/л; 5 –  $C_{\text{ТАГ}} = 0,04$  моль/л; 6 –  $C_{\text{ТАГ}} = 0,06$  моль/л; 7 –  $C_{\text{ТАГ}} = 0,08$  моль/л;  
 8 –  $C_{\text{ТАГ}} = 0,1$  моль/л

Комп'ютерна обробка наведених результатів експериментів за допомогою пакету Statistica 9 (StatSoft, Inc.) дала змогу узагальнити вказані залежності, які в аналітичному вигляді представлені рівнянням (2), та встановити значення максимальної швидкості реакції та констант Міхаеліса ліпази типу B *Candida antarctica* для гліцерину і ТАГ.

$$v_0 = \frac{V_{\max} \cdot C_{\text{ТАГ}} \cdot C_{\text{Гл}}}{K_{M_{\text{Гл}}} \cdot C_{\text{ТАГ}} + K_{M_{\text{ТАГ}}} \cdot C_{\text{Гл}} + C_{\text{ТАГ}} \cdot C_{\text{Гл}}}, \quad (2)$$

де  $v_0$  – початкова швидкість реакції, мкмоль/хв;  $V_{\max}$  – максимальна швидкість реакції, мкмоль/хв;  $C_{\text{ТАГ}}$  – концентрація ТАГ, моль/л;  $C_{\text{ГЛ}}$  – концентрація гліцерину, моль/л;  $K_{M_{\text{ГЛ}}}$  – константа Міхаеліса ліпази типу В *Candida antarctica* для гліцерину, моль/л;  $K_{M_{\text{ТАГ}}}$  – константа Міхаеліса ліпази типу В *Candida antarctica* для ТАГ, моль/л.

Обчислені значення були наступними:  $V_{\max} = 700$  мкмоль/хв,  $K_{M_{\text{ГЛ}}} = 0,012$  моль/л,  $K_{M_{\text{ТАГ}}} = 0,0054$  моль/л.

Отримана залежність (2) відповідає математичній моделі ферментативної реакції, що підпорядковується пінг-понг бі-бі механізму [3,4].

Для перевірки цього твердження було побудовано залежності  $1/v_0 = f(1/C_{\text{ГЛ}})$  при фіксованих концентраціях ТАГ в межах кожної серії експериментів (рис. 2).

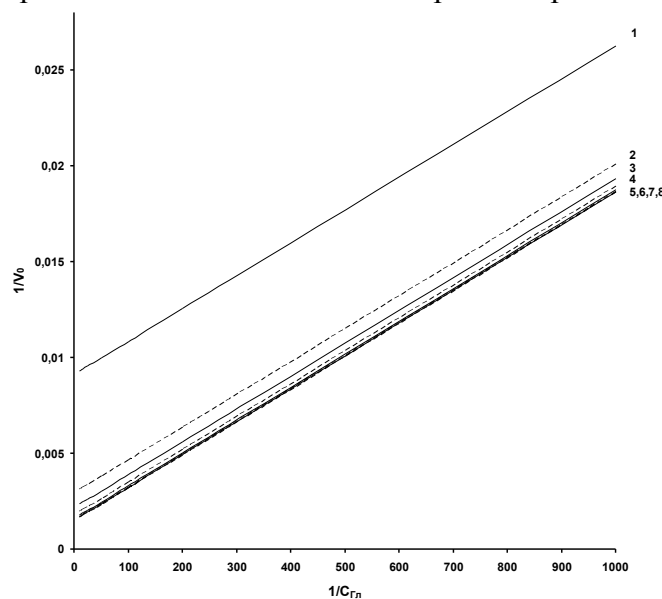


Рисунок 2 – Залежність  $1/v_0 = f(1/C_{\text{ГЛ}})$  при фіксованих концентраціях ТАГ в межах кожної серії експериментів

1 –  $C_{\text{ТАГ}} = 0,001$  моль/л; 2 –  $C_{\text{ТАГ}} = 0,005$  моль/л; 3 –  $C_{\text{ТАГ}} = 0,01$  моль/л;  
4 –  $C_{\text{ТАГ}} = 0,02$  моль/л; 5 –  $C_{\text{ТАГ}} = 0,04$  моль/л; 6 –  $C_{\text{ТАГ}} = 0,06$  моль/л; 7 –  $C_{\text{ТАГ}} = 0,08$  моль/л;  
8 –  $C_{\text{ТАГ}} = 0,1$  моль/л;

Як можна спостерігати (рис. 2), всі залежності  $1/v_0 = f(1/C_{\text{ГЛ}})$  мають лінійний характер та є паралельними між собою, що додатково свідчить про відповідність ферментативної реакції ТАГ з гліцерином пінг-понг бі-бі механізму [5].

Далі готувалося 2 вида модельних сумішей, що відрізнялися від попередніх тим, що в першому – ліпідні субстрати були представлені діацилгліцеридами (ДАГ) і гліцерином, у другому – пальмовою олією (ТАГ) і моноацилгліцеридами (МАГ).

Діацилгліцерини одержували з пальмової олії за розробленою нами технологією [6] з наступним збільшенням вмісту ДАГ до 98 % мас. методом адсорбційної хроматографії в колонках, заповнених сорбентом Florisil (U.S. Silica Company, США), у відповідності із методикою, викладеною в [7].

Моноацилгліцерини отримували з відгону, який утворювався в процесі молекулярної дистиляції продуктів ферментативного гліцеролізу пальмової олії. Жирні кислоти та гліцерин відокремлювали від МАГ повторною дистиляцією. У результаті, отримані МАГ містили 98,2 % основної речовини.

За схемою, викладеною раніше, визначалися залежності початкових швидкостей реакцій від концентрацій субстратів, які як у прямих, так і у зворотних координатах, мали такий же вигляд, як і графіки, наведені на рис. 1 і 2, а в аналітичному вираженні аналогічні рівнянню (2). Це є підставою зробити висновок про те, що, як і у випадку взаємодії ТАГ з гліцерином, ферментативні реакції ДАГ з гліцерином, а також взаємодія ТАГ і МАГ підпорядковуються пінг-понг бі-бі механізму.

Обчислені значення констант Міхаеліса та максимальних швидкостей для ферментативних реакцій ДАГ з гліцерином, ТАГ з МАГ, а також раніш отримані значення для систем ТАГ з гліцерином зведені в табл. 1 і 2.

Таблиця 1 – Значення констант Міхаеліса

Субстрат	ТАГ	ДАГ	МАГ	Гліцерин
$K_M$ , моль/л	0,0054	0,0083	0,0096	0,0120

Таблиця 2 – Значення максимальних швидкостей реакцій

Реакційна суміш	ТАГ + Гліцерин	ДАГ + Гліцерин	ТАГ + МАГ
$V_{max}$ , мкмоль/хв	700	820	875

Аналіз даних, представлених у табл. 1, свідчить про те, що триацилгліцерини, для яких значення константи Міхаеліса найменше, мають найбільшу спорідненість до ліпази типу В *Candida antarctica*. Реакційна здатність у початковий момент часу вища в системі ТАГ+МАГ (табл. 2), що обумовлено емульгуючою властивістю неповного ацилгліцерину.

Таким чином, результати дослідження дають змогу запропонувати представлену на рис. 3 схему ферментативного гліцеролізу ТАГ під дією ліпази типу В *Candida antarctica*.

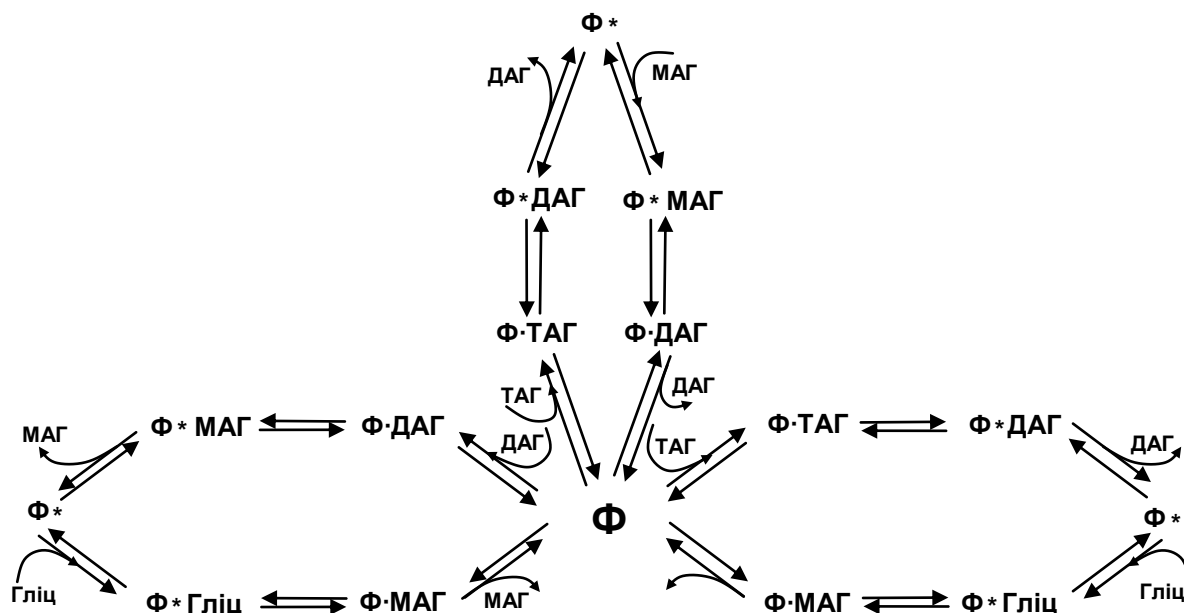


Рисунок 3 – Механізм ферментативного гліцеролізу

Ф – фермент; ТАГ – триацилгліцерин; ДАГ – діацилгліцерин;  
 МАГ – моноацилгліцерин; Гліц – гліцерин; Ф·ТАГ, Ф·ДАГ, Ф·МАГ – фермент-ацилгліцеринові комплекси; Ф\*ТАГ, Ф\*ДАГ, Ф\*МАГ, Ф\*Гліц – фермент-ацильний комплекс у зв'язаній формі;  
 Ф\* – фермент-ацильний комплекс у вільній формі

Спочатку вільний фермент зв'язується з першим субстратом. Фермент-ацилгліцериновий комплекс, що утворюється при цьому, трансформується у фермент-ацильний комплекс у зв'язаній формі. При цьому відбувається перенесення ацильної групи від субстрату на фермент із наступним відщепленням продукту реакції. Потім фермент-ацильний комплекс, що залишився у вільній формі, зв'язується із другим субстратом з передачею на нього ацильної групи. Згодом, комплекс, що утворився, розпадається на другий продукт реакції та вільний фермент. Необхідно відзначити, що всі наведені в схемі етапи реакцій є зворотними.

Таким чином, здійснені дослідження дозволяють зробити висновок, що процес ферментативного гліцеролізу жирів обумовлен одночасним перебігом трьох реакцій:



Для знаходження констант рівноваги кожної із наведених реакції були приготовані модельні суміші ТАГ+Гліцерин, ДАГ+Гліцерин, ТАГ+МАГ. Вихідні компоненти, що брались в еквімолярному співвідношенні, розчиняли в суміші н-гексану та трет-бутилового спирту для утворення гомогенних систем. Кожна реакційна суміш містила 10 % від маси субстратів ферментного препарату Novozym 435. Ферментативні реакції проводились в 2-х паралелях при температурі 60 °С на протязі 6 годин. Кожні півгодини відбирались проби, в яких визначали вміст вихідних речовин та продуктів реакцій. Рівноважні концентрації компонентів для реакції (3) були досягнуті через три години, для реакції (4) – через дві години, для реакції (5) – через півтори години. На основі отриманих даних були розраховані значення констант рівноваги для кожної із реакційних систем:

$$K_1 = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{C_{\text{ДАГ}} \cdot C_{\text{МАГ}}}{C_{\text{ТАГ}} \cdot C_{\text{Гліц}}}; \quad K_2 = \frac{k_2}{k_{-2}} = \frac{C_{\text{МАГ}}^2}{C_{\text{ДАГ}} \cdot C_{\text{Гліц}}}; \quad K_3 = \frac{k_3}{k_{-3}} = \frac{C_{\text{ДАГ}}^2}{C_{\text{ТАГ}} \cdot C_{\text{МАГ}}}. \quad (6)$$

Результати досліджень зведено в табл. 3.

Таблиця 3 – Вміст компонентів реакційних систем при досягненні рівноваги

Вміст при досягненні рівноваги, % мас.	Реакційна суміш		
	ТАГ + Гліцерин	ДАГ + Гліцерин	ТАГ + МАГ
ТАГ	7,0	–	18,0
ДАГ	42,2	20,1	72,3
МАГ	48,0	76,4	9,1
Гліцерин	1,1	3,0	–
Константа рівноваги	94,18	43,85	25,22

**Висновки.** Аналіз чисельних значень констант рівноваги свідчить про те, що в усіх системах прямі реакції перевищують зворотні, тобто спрямовані в бік отримання продуктів. Крім того, реакція (3) є домінуючою в процесі гліцеролізу жирів та має найбільший ступінь перетворення.

#### Література

1. О'Брайен Р. Жиры и масла. Производство, состава и свойства, применение / Р.О'Брайен; пер. с англ. 2-го изд. В. Д. Широкова, Д. А. Бабейкиной, Н.С. Селивановой, Н.В. Магды. – СПб.: Профессия, 2007. – 752 с.
2. AOCS. In: Firestone D, editor. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemist's Society. 5th ed. Champaign, IL: American Oil Chemists' Society (AOCS), 2003.
3. Bisswanger H. Enzyme kinetics: principles and methods / H. Bisswanger. – Germany: WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2002. – 260 p.
4. Frey P. A. Enzymatic reaction mechanisms / P. A. Frey, A. D. Hegeman. – USA: Oxford University Press, New York, 2007. – 848 p.
5. Taylor K.B. Enzyme kinetics and mechanisms / K.B. Taylor. – USA: Kluwer Academic Publishers, New York, 2002. – 227 p.
6. Некрасов П.О. Оптимізація процесу молекулярної дистиляції при отриманні жирів, збагачених діацилгліцеридами / П.О. Некрасов // Інтегровані технології та енергозбереження. – Харків: НТУ "ХПІ", 2009. – №3. – С. 75–81.
7. Wright A.J. The effect of minor components on milk fat crystallization / A.J. Wright, R.W. Hartel, S.S. Narine, A.G. Marangoni // JAOCS. – 2000. – Vol. 77, №5. – P. 463–475.

УДК 665:664.3

Некрасов П.А.

#### **ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГЛИЦЕРОЛИЗА ЖИРОВ**

В работе установлено, что ферментативный глицеролиз жиров подчиняется пинг-понг би-би механизму. Согласно разработанной схеме механизма, глицеролиз является сложным процессом, включающим три конкурентные реакции. Вычисленные константы равновесия дали возможность определить, что одна из реакций является доминирующей.

Nekrasov P.O.

#### **ENZYMATIC FATS GLYCEROLYSIS MECHANISM INVESTIGATION**

In presented work it was ascertained that enzyme-catalyzed glycerolysis of fats obeys ping-pong bi-bi mechanism. According to the mechanism scheme the glycerolysis is the complex process which involves three competitive reactions. Computed equilibrium constants gave an opportunity to establish the dominant reaction.